Scuola d'Applicazione di Sanità Militare

SUL FENOMENO

dell'

Agglutinazione del sangue

RICERCHE

per il dottor

ENRICO GILARDONI
Tenente Medico

MILANO
CASA EDITRICE DOTTOR FRANCESCO VALLARDI
Corso Magenta 48

Scuola d'Applicazione di Sanità Militare

SUL FENOMENO

dell'

Agglutinazione del sangue

RICERCHE

per il dottor

ENRICO GILARDONI

Tenente Medico

MILANO

CASA EDITRICE DOTTOR FRANCESCO VALLARDI

Corso Magenta, 48

Estratto dalla *Gazzetta degli Ospedali e delle Cliniche*
N. 44. Anno 1903

Stabilimento dell'Antica Casa Editrice Dottor FRANCESCO VALLARDI
Milano Corso Magenta N. 48.

La letteratura riguardante i enomeno dell'agglutinazione del sangue fu iniziata soltanto alcuni anni dopo gli studi sull'agglutinazione microbica.

Fu tra il 1895-96 che Bordet (1) in uno studio sul modo di azione dei sieri preventivi cominciò ad accennare « ad una curiosa modificazione » interveniente nelle emazie tenute in sospensione in un po' di siero di cavia, allorchè ad esso mescolava una piccola quantità di siero di coniglio: alla loro unione cioè in ammassi perfettamente delimitati: non solo; ma fin da allora Bordet riconosceva la sorprendente analogia che decorre tra l' agglomerazione dei globuli rossi di un dato animale per opera di un siero d'animale di specie diversa, e quella che presentano i microbi influenzati da un siero preventivo (Widal, Gruber e Durham, ecc.). Poco dopo, nel 1897, M. Elfstrand (2) riscontrò siffatta agglomerazione o agglutinazione, facendo agire sulle emazie di certi animali, talune tossialbumine, quali la crotina, la ricina, l'abrina. E contemporaneamente Bordet ancora ritornava sulle sue precedenti osservazioni per stabilire il parallelismo esistente tra *bacteriolisi e emolisi* (3). Emolisi che formò oggetto di particolari successivi studii non solo a Bordet (4), ma anche al Nolf (5), al Cantacuzène (6), ad Ehrlich e Morgenroth (7), e ad altri: i cui lavori, sebbene indirettamente, interessano chi s'occupa dell'agglutinazione globulare.

La quale fu poi riscontrata nel 1900 in tutt' altro campo di indagine da Lo Monaco e Panichi (8), studiando cioè il sangue dei malarici.

Lo Monaco e Panichi pei primi osservarono che il sangue malarico (o il suo siero) ha la proprietà costante di agglutinare le emazie di uomo sano o malarico, mentre tale proprietà manca al sangue di uomo sano mescolato con emazie di uomo pure sano.

Dopo il reperto di Lo Monaco e Panichi il fenomeno dell'agglutinazione dei globuli rossi fu oggetto in breve volgere di tempo, per parte di non pochi osservatori, di numerose ricerche, tendenti a precisarne i caratteri, le condizioni di realizzazione, il valore diagnostico per certe infezioni, ecc. Ma tali ricerche non riuscirono tutte tra loro concordi; specialmente per la differente tecnica usata dai vari autori, donde le controverse interpretazioni del significato fisiologico e diagnostico di così interessante fenomeno. Così, mentre Grixoni (9) ritenne il fenomeno dell'agglutinazione specifico per la sola malaria, i dottori Novi e Meruzzi (9 bis) lo riscontrarono, oltrechè nei malarici, nel prolungato digiuno, nell'affaticamento, e in parecchie malattie; il dottor Capogrossi, in più d'una pubblicazione (10, 11), affermò aver riscontrato l'agglutinazione più o meno costante tanto in malarici, come in altri ammalati, quanto in individui sani. Presso a poco di tale opinione si dimostrarono anche l'Ascoli (12), il Pace (13), l'Eisemberg (14), ecc.

Questa è, a rapidi tratti, per quanto mi costa, la letteratura riguardante il fenomeno dell'agglutinazione del sangue.

Il quale fenomeno interessa direttamente, per sè stesso, anche se facciamo astrazione dal significato fisiologico e clinico che ad esso si può attribuire; quando cioè solo lo si consideri nella sua patogenesi, e nei rapporti di analogia che decorrono tra agglutinazione emo-globulare e agglutinazione microbica, tra queste e l'agglutinazione provocabile nel latte, nell'argilla in date circostanze di esperimento: e che ormai possiamo dire accertati sopratutto per merito delle classiche prove di Duclaux e di Bordet.

I quali autori, in base appunto a tali rapporti di analogia, poterono stabilire per le varie forme di agglutinazione (la *microbica*, la *globulare* e la *granulare*, dirò così) una unica comune spiegazione, secondo cui l'agglutinazione si ridurrebbe ad una semplice riunione di particelle (organiche o inorganiche), le cui relazioni di adesione col liquido ambiente, sieno state modificate da speciali agenti.

Sulla guida di questi criteri iniziai le mie modeste ricerche,

prendendo come punto di partenza un notevole lavoro dei dottori Altobelli e Memmo, comparso or fa un anno nel giornale medico del R. Esercito (15), riguardante l'agglutinazione microbica ottenuta, anzichè con sieri specifici, con sostanze chimiche varie. Questi autori, continuando ricerche precedentemente fatte da Malvo (16), Bossaert, Lambotte, Blachstein, ecc. poterono riprodurre e studiare l'agglutinazione dei bacteri, non già con sieri di ammalati di particolari infezioni (tifo, colera, carbonchio), ma con diverse sostanze chimiche, delle quali molte entrano nella costituzione nostra organica in stato fisiologico o patologico. In base pertanto alla già accennata analogia esistente tra le varie forme di agglutinazione, ho cercato di vedere se, anzichè con sieri specifici, si potesse del pari riprodurre perfettamente l'agglutinazione dei globuli rossi, mediante analoghe sostanze chimiche. La ricerca aveva il suo interesse, poichè, se è nota l'importanza, in genere, dei sali nella nostra economia organica, è del pari apprezzata l'alta importanza della reazione, nonchè dell'equilibrio salino nel sangue in particolare.

Vi ha una piccola letteratura riguardante gli studii sul sangue in rapporto a diversi agenti chimici: studii, per altro, che non riguardano punto il fenomeno dell'agglutinazione, almeno per quanto mi consta. Hamburger (17) fin dal 1886, e di poi S, G. Hedin (18), Gryns (19), Hofmeister (20) studiarono con molta cura l'azione dell'acqua e di molte soluzioni saline di varia concentrazione sulle emazie, determinandone il punto di concentrazione isotonico o neutro; la permeabilità o meno dei varii globuli, secondo i varii ioni componenti i sali, le leggi sulla pressione osmotica, per cui le emazie possono modificare il loro volume o cedere l'emoglobina. Le ultime ricerche del genere sono quelle di Nolf (21); ma anche queste, anzichè l'agglutinazione delle emazie, riguardano l'*emolisi* delle stesse per opera sia dei sieri emolitici normali, o attivi, sia per opera di determinate soluzioni saline ipo od-iper-toniche; esse tuttavia hanno importanza, perchè rivelano come le bacteriolisine e le emolisine, in una parola queste misteriose cosidette *alexine*, non sono punto, come le reputava Buchner e come le reputarono tanti altri dopo di lui, dei fermenti proteolitici, ma sostanze che agiscono nè più nè meno come le soluzioni saline, le sostanze chimiche da lui studiate. Tutto ciò non costituiva che un argomento di più per studiare sotto un analogo punto di vista le *agglutinine* del sangue e dei sieri.

Saggiai anzitutto molti sali scelti sia tra quelli per cui le emazie non lo sono affatto, provandoli in soluzioni progressivamente decrescenti, dalle più concentrate (50 0[0-20 0[0-10 0[0-5 0[0) alle meno (0,03 0[0-0,02 0[0), usando il più delle volte sangue di cavia (che si comporta generalmente come quello umano); talvolta sangue di uomo sano, di pollo, di cane, di rana, ecc. Procurai di adottare costantemente per tutto il lungo periodo di ricerche lo stesso tecnicismo, molto semplice del resto: adoperai sempre due aghi di platino foggiati ad ansa rotonda; l'una ampia per la soluzione salina, l'altra molto piccola per il sangue, che veniva tolto fresco, volta per volta per ogni esame, dal lobulo del padiglione per l'uomo, da una venuzza marginale dell'orecchio per le cavie, dalla cresta del pollo e così via.

Deposta una goccia di soluzione salina mediante l'ansa maggiore sul vetrino portaoggetti, praticavo con uno spillo la piccola puntura necessaria per ricavare una goccia di sangue freschissimo, che con rapidità portavo nel mezzo della goccia di soluzione salina, mediante l'ansa minore, agitandola lievemente. Indi con sollecitudine sovrapponevo con lieve pressione, il vetrino coprioggetti, già munito in precedenza della goccia d'olio di cedro per l'esame ad immersione omogenea (il più opportuno, in genere, allo scopo).

Dei sali e delle sostanze saggiate una gran parte si è dimostrata rispetto al fenomeno dell'agglutinazione perfettamente inerte; con ogni specie di sangue usato per la prova le soluzioni di cloruro di calcio (spinte anche al 10 0[0), quelle di cloruro di bario; nitrato di bario; cloruro di sodio; cloruro potassico; cloruro di ammonio; cloruro di stronzio; cloruro d'alluminio; cloruro di manganese; solfato potassico; fosfato potassico; fosfato sodico; cianuro potassico; solfociaruro potassico; ferrocianuro potassico; carbonato d'ammonio; solfato di magnesia; carbonato di calcio; solfato alluminico, potassico; cloruro di magnesio; acetato potassico; acetato sodico, nelle più varie diluizioni non mi diedero mai alcuna agglutinazione.

Anche le *soluzioni di chinino* (bicloruro) spinte a concentrazioni fortisime (50 °/₀ e più) non mi diedero agglutinazione di sorta: così dicasi dell'*urea* e del *peptone* in soluzioni varie dal 30 °/₀ al 0,02 °/₀; l'urea distrugge i globuli rossi con notevole rapidità, anche in soluzioni che hanno una pressione osmotica doppia, quadrupla, quintupla del plasma.

Con *urine di malarici* emesse durante e dopo l'accesso febbrile riscontrai l'agglutinazione globulare, analogamente alla agglutinazione microbica trovata nelle urine dei tifosi da Gorbonnow (21 bis); ma i miei risultati non furono sempre costanti: epperò non credo, per ora, di insistervi.

Ottenni invece costante agglutinazione dei globuli rossi per mezzo di soluzioni variamente concentrate delle seguenti sostanze:

1) *Col gruppo di sali semplici di ferro: acetato di ferro, solfato ferroso, cloruro ferroso e cloruro ferrico.* Tali sali agglutinano bene i globuli rossi, riproducendoli in modo caratteristico senza provocare deformazioni molto sensibili alle emazie: eccezione fatta per l'acetato di ferro, il quale avendo eziandio una spiccata e rapidissima azione emolizzante sul globulo, non si presta bene per la buona osservazione del fenomeno di agglutinazione.

Questa è più o meno intensa da sale a sale, da soluzione a soluzione; il cloruro ferrico nelle soluzioni del 3 %-2 % al 0,05 %-0,03 % dà le più tipiche agglutinazioni e ciò in analogia a quanto trovarono per certi microrganismi Altobelli e Memmo, sebbene con soluzioni molto più concentrate (5 %).

Le *soluzioni di gelatina* diluite nelle proporzioni succitate mi diedero pure costantemente bellissime agglutinazioni globulari.

Anche questo reperto mi veniva a provare vieppiù quanto fondamento di vero abbia il geniale concetto di Duclaux che riduce l'agglutinazione ad un fenomeno di coagulazione, coi suoi caratteri e noti e misteriosi. Mai come per l'agglutinazione dei globuli rossi, così artificialmente provocata, io credo tale concetto può trovare ad ogni prova migliore conferma. Facendo gli stessi preparati microscopici, allorchè si adoperano le soluzioni più forti, si può vedere, prima ancora di porre i vetrini sotto la lente, l'*agglutinazione macroscopica*, ossia la formazione di grandi ammassi di emazie fra loro agglutinatesi istantaneamente al contatto colla soluzione di prova: si avverte cioè una specie di coagulazione. Colle soluzioni più diluite tutto ciò non si avverte più ad occhio nudo; pur però verificandosi l'agglutinazione (*microscopica*) dei globuli rossi in ammassi di 12-10-8-5-3 per gruppo; tanto meno numerosi cioè quanto meno concentrata è la soluzione agglutinate; l'aspetto è preciso, identico a quello che si osserva colle emazie agglutinate mediante sieri specifici (di malarico, di a. vaccinato, ecc.) (*).

(*) Unendo la gelatina col percloruro di ferro ottenni agglutinazioni ancora più evidenti: il che forse può avere un'importanza pratica per accrescere il potere emostatico delle soluzioni gelatinose.

3) Tra i sali metallici notai dotato di un forte potere agglutinante il *nitrato d'argento*.

4) Molto agglutinante trovai la *vesuvina* (in soluzioni acquose dal 4 °/₀ all' 1 °/₀, al 0,50 °/₀-0,12 °/₀) che già Malvoz aveva dimostrata capace di produrre l'agglutinazione dei bacilli del tifo. Essa però ha anche una forte azione emolizzante.

5) Accennerò brevemente alla notevole azione agglutinante del *bicloruro di mercurio puro*, che saggiai in soluzioni progressivamente decrescenti dal 5 °/₀ al 0,02 °/₀. Degno di nota è il fatto che l'agglutinazione appare assai meno spiccata con soluzioni al 3-4-5 °/₀ fatte coi trocisci di sublimato corrosivo fabbricate dalla farmacia centrale militare in miscela con del cloruro sodico; già le soluzioni al 2 °/₀ non agglutinano più ed anche quelle più concentrate provocano agglutinazioni niente affatto tipiche. È noto che il bicloruro di Hg. unito al Cl Na, perde il potere di precipitare gli albuminoidi; tale fatto potrebbe spiegare il diverso comportamento della stessa sostanza; come pure potrebbe anche dare ragione del perchè il sublimato (conforme a recenti studî) abbia diminuita la sua forza disinfettante se unito al cloruro sodico.

Comunque: non dimentichiamo il reperto, che più avanti dovremo ancora ricordare.

6) Pure la *bile* agglutina, anche se notevolmente diluita: tuttavia la sua altissima azione emolizzante rende malagevole la retta osservazione del nostro fenomeno.

In una seconda serie di ricerche, analogamente a quanto praticarono Altobelli e Memmo per l'agglutinazione microbica, ho voluto studiare se, e quale influenza esercitano gli *acidi* e gli *alcali* sul sangue (in riguardo al fenomeno della agglutinazione) in varie soluzioni dal 5-4 °/₀ sino a quelle del 0,070-0,030-0,010 °/₀: comparando volta per volta i risultati che ottenevo colle soluzioni basiche, e quelli avuti colle soluzioni acide di pari grado.

Orbene: io ho osservato costantemente, senza eccezione, per tutti gli acidi presi in esame, ed entro i limiti sopra indicati, l'agglutinazione dei globuli rossi, più o meno intensa, e caratteristica: e ciò pure in analogia a quanto Altobelli e Remmo trovarono per l' agglutinazione microbica mediante soluzioni acide, sebbene alquanto più concentrate di quelle da me usate.

Noterò subito per altro che se per tutti gli acidi presi in esame il fenomeno dell' agglutinazione globulare si verifica,

esso non si ripete per ogni acido in un modo del tutto identico. In altre parole: l'agglutinazione è bensì costante: per le soluzioni forti già l'agglutinazione macroscopica appare evidentissima, spesso istantanea; tuttavia si può dire che quasi per ciascun acido, e per ogni diluizione di esso gli ammassi delle emazie dimostrano con evidenza qualche particolarità o nel modo di formarsi, o nella reciproca dispos zione, o nella loro grandezza, persistenza, colorazione, ecc., varietà di particolari nella cui patogenesi stanno come cause prime l'iper- o l'ipo-isotonia delle singole soluzioni di prova, e la permeabilità o no delle emazie agli ioni delle varie sostanze usate. Sarà utile qualche accenno più particolareggiato. Già accennai all'emolisi, che succede così spesso all'agglutinazione: orbene, l'emolisi è rapidissima a intervenire non appena noi provochiamo l'agglutinazione con *acido lattico*, tanto da rendere malagevole la ricerca microscopica; altrettanto dicasi per l'*acido acetico* e pel *citrico*.

I globuli nucleati, quali quelli di pollo ad esempio, si prestano, per simili prove, meglio di quelli di cavia o d'uomo, poichè, pur dissolvendosi anch'essi con una certa rapidità, lasc ano visibili nel campo microscopico i loro nuclei, sotto forma di tanti punticini splendenti, molto caratteristicamente adunati in ammassi sparsi qua e là. L'emolisi invece è più tarda ad intervenire nelle emazie agglutinate mediante soluzioni più o meno diluite *di acido cloridrico*, *solforico*, *nitrico*. Violenta è l'agglutinazione *da acido picrico* in soluzione acquosa, p. es di 0,50 % e più.

Man mano invece s saggiano soluzioni minori sino al 0,10, 0,08 %, il fenomeno si riscontra tuttavia, ma con maggior difficoltà si può osservarlo, in causa della rapida sopravveniente emolisi. *L'acido fenico* pure agglutina, sebbene non rapidamente. Bellissime al contrario sono le agglutinazioni ottenute colle varie soluzioni *di acido ossalico*, e *di acido tartarico*: il fenomeno non è così violento, l'agglutinazione non è così compatta come cogli *acidi picrico*, *osmico* e *minerali più forti*; ma in compen o appare tipica, elegante, caratteristica: le varie emazie (di cavia, pollo, uomo, ecc.) permangono agglutinate, senza perdere le loro principali caratteristiche, senza dimostrare alterazioni molto grossolane nei loro contorni: soltanto in capo a qualche tempo i globuli rossi cominciano ad impallidire, ma non tutti in egual misura, nè contemporaneamente. Come osservazione generale

dirò che le più belle agglutinazioni di solito le ottenevo colle soluzioni acide all'1 0[0 circa.

Inversamente agli acidi si sono comportate le *soluzioni alcaline*. Esse non agglutinano punto; bensì scolorano, dissolvono, disgregano, distruggono con rapidità notevole (quasi instantaneamente per le soluzioni più forti) le emazie, cosicchè di queste non rimangono che frammenti molli e filanti (fibrina dello stroma), e nel campo microscopico appare una colorazione uniforme giallognola: conseguenza appunto della rapida emolisi effettuatasi. Molte volte per altro si può cogliere sotto la lente il momento in cui la soluzione viene a contatto con emazie, le quali accidentalmente non avevano ancora subita la mescolanza coll'alcali. Si vedono in tale momento queste emazie rapidamente scolorirsi, sciogliersi, sparire del tutto. Con soluzioni alcaline forti (3-4 0[0) già ad occhio nudo si può avvertire la dissoluzione, la distruzione completa, e pressochè istantanea delle emazie: la goccia di sangue da rosso assume un colore bruno-nerastro, l'osservazione al microscopio è malagevole ed ha poco risultato. Colle soluzioni alcaline più deboli si vedono i globuli diventare sferici, rotondi: anche quelli di pollo assumono uguale forma, il loro nucleo si appiattisce, indi nel grembo di ciascuna emazia si svolge più o meno lentamente il fenomeno della emolisi.

Notato questo antagonistico modo di comportarsi rispetto all'agglutinazione delle soluzioni acide in confronto di quelle alcaline, antagonismo del resto molto facile a comprendersi, ho cercato, sempre in analogia alle più volte ricordate ricerche di Altobelli e Memmo sui microbi: 1) di vedere se nei preparati microscopici dove apparivano bene agglutinate le emazie per opera di una soluzione acida, potessi provocare il disgregamento degli ammassi, e vedere qnindi liberarsi i globuli rossi, col far penetrare al di sotto del vetrino coprioggetto una goccia di soluzione alcalina: 2) di ottenere inversamente mediante acido l' agglutinazione delle emazie poste in ambiente alcalino. La delicatezza, la fragilità dei globuli rossi da un lato, l'azione rapida dissolvente delle soluzioni alcaline dall' altro lato, non mi hanno permesso di rilevare questo secondo punto con quella sicurezza nei risultati d'osservazione, che è necessaria, mentre si comprende come l'esperienza analoga potesse più facilmente riuscire coi microrganismi. Per quanto riguarda la prima prova per al-

tro, dopo più tentativi fatti con soluzioni variamente diluite con alcali e acidi diversi, riuscii a vedere nel campo microscopico gli ammassi grandi e piccoli di globuli tipicamente agglutinati per acido, districarsi, disgregarsi, disciogliersi al contatto di un soluto alcalino.

Il fenomeno è interessante, anche perchè può meglio illustrare il concetto della agglutinazione: esso merita la paziente ricerca. La quale riesce bene di solito quando ad es. si proceda così: dapprima si provoca l'agglutinazione dei globuli rossi di cavia mediante 1 goccia di soluzione d'acido tartarico all'1 0[0. Si porta il preparato sotto la lente ad immersione o, meglio per questo caso, sotto lente più debole, avendo cura di tenere in osservazione gli ammassi globulari più vicini ad uno degli orli del vetrino coprioggetto, indi si depone senz'altro su questo orlo una goccia di soluzione di potassa caustica al 4 0[0; si vedrà allora che man mano la corrente alcalina entra investendo la prima serie di ammassi d'emazie agglutinate, queste vanno liberandosi fra loro, e ciascuna di esse, resasi libera, s'avvia, seguendo le altre, ma per proprio conto, nella direzione della corrente, nella quale viene, colle altre, travolta, sommersa, per poi dissolversi e sparire del tutto.

Ne è a dirsi che tale disgregamento si operi in forza della corrente liquida per sè sola, poichè quando detta corrente è costituita da una soluzione indifferente, si vedono gli ammassi interi, come tanti blocchi, muoversi e venire travolti, senza che anche poche emazie se ne distacchino.

L'analogia tra agglutinazione globulare ed agglutinazione microbica aveva così una conferma di più.

Portando un rapido sguardo riassuntivo sui dati e sui risultati sin qui esposti, si potrà al proposito facilmente avanzare un'osservazione, direi pregiudiziale: si potrà cioè osservare che l'agglutinazione artificiale dei globuli rossi ottenuta mediante sostanze chimiche varie, quand'anche per nulla si possa (come in realtà avviene) differenziare all'esame microscopico da quella in modo naturale prodotta da sieri specifici, tuttavia non può avere importanza pratica dal punto di vista fisio-patologico, in quanto essa può essere provocata soltanto con soluzioni, che non scendono quasi mai sotto il limite minimo di 30-20 milligr. per 100 gr. di acqua. Riconosco subito che a questa osservazione si può accordare un certo valore; non però senza riserva. Invero io

penso che il limite suaccennato scenderebbe molto più sotto, se il fenomeno dell'agglutinazione non fosse disturbato, e sopraffatto dall'emolisi, che rapida interviene colle soluzioni molto diluite. Peraltro noto come pei varî microrganismi da essi studiati Altobelli e Memmo riuscirono a provocare l'agglutinazione artificiale, aggiungendo *in vitro* a 2 cc. di emulsione acquosa bacterica 1-2-6 goccie di soluzione salina o acida almeno all'1 0[0. Naturalmente questo non vorrebbe dir nulla senza un altro fatto molto importante: fatto già segnalato dal Malvoz, e confermato di poi da Altobelli e Memmo. Al Malvoz fu dato dimostrare come l'*acido acetico* aggiunto in proporzioni minime a del siero di sangue normale conferisca al medesimo un altissimo potere agglutinante per certi bacterî, mentre l'acido acetico per sè solo si dimostra debolissimo nel provocare l'agglutinazione bacterica. È bensì vero che molti altri acidi (pur agglutinanti dei microbi in alto grado) in contatto col siero si comportano precisamente al contrario dell'acido acetico: ma tutto ciò prova che t a sieri e acidi possono decorrere o non decorrere reazioni, trasformazioni chimiche, le quali, se ci sfuggono nelle loro particolarità, tuttavia ci inducono ad attribuire una certa importanza fisio-patologica a quelli di questi sali o acidi che entrano attivamente nel nostro ricambio organico, si fisiologico che patologico. E forse sarà precisamente proseguendo su questo campo di indagini, che si arriverà a togliere il fitto velo, che ancor ci rende misteriosi p. es. i fenomeni dell'assorbimento, delle secrezioni, degli scambî organici: e che un giorno ci appariranno, regolati soltanto da semplici leggi fisiche-chimiche (*).

Ma pur lasciando queste considerazioni, pur non accordando nessuna importanza ai risultati delle suesposte ricerche circa il significato fisiopatologico dell'interessante fenomeno che ci occupa, non credo giusto non riconoscere che esse ci possono aiutare a chiarirne il concetto patogenetico.

Richiamandoci per un momento agli studî del Nolf sulle *emolisine* od *alexine* di certi sieri, studî che hanno provato come esse provochino l'emolisi allo stesso modo di molti

(*) Una prova di quanto dico l'abbiamo già negli importantissimi e recenti studii iniziati dall'Oker-Blom sul grado di conducibilità elettrica delle emazie delle cellule vegetali o animali in genere allorchè dal plasma o dalla linfa penetrano oppur no integri, o dissociati in ioni, i varii elettroliti. Un'altra prova l'abbiamo nella formazione di anticorpi per parte delle cellule di un organismo sotto l'influenza di molti agenti chimici.

agenti chimici, riesce naturale, nel riflettere sui nostri risultati, convincerci che, ammessa l'esistenza di queste misteriose *agglutinine*, esse, al pari delle alexine, svolgano la loro particolare azione come semplici composti chimici. Invero nell'agglutinazione globulare, in modo artificioso provocata mediante acidi o sali o altre sostanze chimicamente note, se la sostanza agglutinata vien data dalle emazie, quella agglutinante, l'ipotetica agglutinina, non si potrebbe ammettere se non nella soluzione di prova. Ora: anche in questa agglutinazione come in ogni altra forma di agglutinazione (secondo insegna la teoria di Duclaux e Bordet) il fenomeno decorre in due momenti ben distinguibili e separabili sperimentalmente tra loro: 1.° la incognita modificazione dei globuli per opera della agglutinina; 2.° l'attrazione reciproca degli stessi così modificati nel liquido ambiente. Nell'agglutinazione da sostanza chimica il 1.° momento evidentemente non può essere costituito che da una *azione chimica* esercitata dall'acido o dal sale sul globulo: in ispecie sulla sua superficie di involucro; il 2.° momento è un fatto del tutto *fisico*, cui i globuli soggiacciono in quanto sono stati posti, dall'azione chimica testè subita, nella condizione necessaria e sufficiente perchè l'agglutinazione sia fisicamente possibile: *fenomeno fisico* che si può riprodurre con altri mezzi, per altre vie (Norris-Larder-Brunton), anche in certe sostanze inorganiche (granuli d'inchiostro di China, particelle di sughero con pallini di piombo), e che si può annullare quando si distruggano gli effetti della reazione chimica, come dimostrano le prove fatte colla potassa caustica sulla agglutinazione da acido tartarico: *reazione chimica* fine e delicata, grossolana o violenta, a seconda delle diluizioni usate. Come e perchè si svolge il fenomeno fisico? Perchè gli eritrociti normali non s'attraggono tra loro in ammassi, mentre lo fanno quelli che hanno subita l'azione chimica dell'agglutinina del siero, o delle nostre sostanze? Perchè i pezzetti di sughero contenenti un pallino di piombo sommersi nell'acqua non si attraggono fra loro, mentre questa attrazione subiscono se prima sono bagnati nel petrolio?

La risposta a queste domande è di spettanza della fisica colle sue leggi sull'attrazione capillare, sulla tensione superficiale dei corpi e dei liquidi, ecc. Non è il caso di indagare oltre su questo punto; ma a nostra volta possiamo chiederci: di quale natura è l'azione chimica che svolgono i sali e gli acidi rivelatisi agglutinanti? Penso che essa si possa ritenere

come una *forma iniziale di coagulazione*. In appoggio a tale concetto basterebbe richiamare le geniali esperienze di Duclaux e di Bordet sull'agglutinazione in genere, e su quella del latte e dell'argilla in particolare. Ma se diamo uno sguardo alla serie delle sostanze chimiche che ci diedero l'agglutinazione, e all'altra serie di quelle le quali si mostrarono inette a produrre il fenomeno stesso, avvertiremo tosto come tra le prime si annoverino sostanze comunemente note quali coagulanti delle albumine; e sostanze che accelerano o producono la coagulazione del sangue; ricordiamo ad es. l'azione del percloruro di ferro; quella delle soluzioni di gelatina, la quale, secondo Dastre e Floresco, agirebbe (*) proprio come *zimoeccitatrice sul fibrenzima;* e ciò sopratutto per la sua *reazione acida*; l'azione del bicloruro di mercurio puro in confronto a quello unito col cloruro di sodio: ricordiamo l'azione dei sali biliari e degli acidi in genere, i quali si fissano sulle emazie e non sul siero (Hamburger), al contrario degli alcali, che vengono fissati invece solo dal siero, e dei quali è nota la proprietà di ritardare o anche inibire la coagulazione: proprietà condivisa da molti sali, da noi studiati, quali: carbonato sodico e potassico; acetato sodico e potassico; nitrato sodico e potassico; solfato sodico, potassico, magnesiaco; cloruri alcalini, fluoruri alcalini, ecc.

Si potrà obbiettare: se così fosse, noi dovremmo avvertire delle alterazioni manifeste nei globuli rossi agglutinati. Per verità alterazioni, specie negli strati più superficiali delle emazie, si verificano, ed appaiono anche manifeste, ma solo quando usiamo delle soluzioni piuttosto concentrate: anzi per certe sostanze ho potuto più volte, non sempre però, constatare che i globuli rossi apparivano uniti tra loro da una sostanza, di cui non saprei precisare la vera natura, ma che aveva tutta l'apparenza di un finissimo reticolo, molto fitto, di fibrina. Usando invece soluzioni molto diluite, queste modificazioni negli strati più periferici delle emazie non sono tali da apparirci ben chiare alla nostra osservazione: ma tali ad ogni modo da produrre quelle condizioni nuove di adesione molecolare, di tensione, quelle condizioni fisiche, in una parola, necessarie e sufficienti, perchè il secondo momento del fenomeno si avveri.

Trasportiamoci ora dal campo dell'agglutinazione artificiale

(*) (Nel provocare la coagulazione, s'intende).

a quello dell'agglutinazione naturale e domandiamoci subito: esistono veramente nel sangue o nei sieri agglutinanti (prendiamo come esempio e tipo quello *malarico*), gli agenti, che noi sappiamo possono provocare, date certe altre condizioni e circostanze, la coagulazione? È noto che perchè questo ancora oscuro fenomeno si compia, oltre un dato *equilibrio salino* (sul che insistemmo altrove), occorrono: il *fibrinogene* e un *enzima*, che sul fibrinogene operi. Del fibrinogene, componente proteico di ogni plasma, è inutile dire. Ma questo fibrenzima, o plasmasi, o protrombina [come lo chiama Pekelharing (22)], che non esiste normalmente nel sangue circolante dell'uomo sano, esisterà in quello agglutinante, in quello malarico? La risposta, a mio credere, non può logicamente essere se non affermativa: invero che cosa è questo fibrenzima se non il prodotto del disfacimento degli elementi morfologici del sangue? Ebbene: nel malarico, come nel tifoso, come nelle anemie acute e croniche, ad intermittenze o di continuo, rapida o lenta si verifica appunto una alterazione, uno sfacelo di codesti elementi morfologici: epperò in circolo si deve trovare il prodotto di tale distruzione; il fibrenzima, o la protrombina cioè, sempre pronta a trasformarsi in *trombina*, ossia a provocare la coagulazione, quando si apprestino le circostanze opportune.

Nell'agglutinazione artificiale questo agente della coagulazione manca nella soluzione salina o acida di prova; questa però evidentemente nella sua azione chimica sulla emazia al suo primo contatto la trae dalla stessa. Non dimentichiamo d'altra parte a questo proposito che se il fenomeno di agglutinazione si può ritenere come una forma iniziale di coagulazione, non è lecito identificare addirittura l'un fatto all'altro.

Da tutto quanto sono venuto esponendo, mi sono fatto il convincimento che l'agglutinazione emo-globulare possa servire come un indice, un reattivo, direi, abbastanza fine, per svelarci la alterazione, la distruzione, il disfacimento, che su più o meno grande scala può verificarsi degli elementi morfologici del sangue nell'organismo nostro in determinate circostanze; e sotto questo punto di vista credo che tale fenomeno potrà, *in base ad ulteriori ricerche*, acquistare anche una maggiore importanza diagnostica, clinica (*).

(*) Nei casi, per esempio, dei tumori maligni incipienti; oppure nel periodo di incubazione di qualche infezione acuta, ecc.

Io non so se a questi stessi concetti si inspirò Eisenberg (23), allorchè ammise che le agglutinine non hanno nulla di specifico, e che esse non sono se non la espressione della reazione dell'organismo sul riassorbimento delle parti componenti gli eritrociti. In fondo in fondo questa opinione, sebbene espressa sotto forma alquanto vaga, si può ritenere pressochè concorde colla conclusione suesposta. Ecco perchè non posso accettare le obbiezioni che al concetto di Eisenberg mossero in uno dei loro ultimi pregevoli lavori Lo Monaco e Panichi, basandosi sopra due fatti da loro riscontrati:

1) che cioè la capacità agglutinante è più alta nei processi infettivi acuti, che non nelle malattie discrasiche;

2) che la chinina *in vitro* neutralizza le agglutinine malariche e non le altre.

Il primo fatto addotto sembrami riesca piuttosto a convalidare che non a combattere l'opinione di Eisenberg, poichè lo sfacelo dei globuli rossi è più energico, più rapido, sebbene molto meno duraturo, nei processi infettivi acuti (quali la malaria, la febbre ricorrente, ecc.), che non nelle forme lente di discrasie sanguigne. Per quanto riguarda poi il secondo fatto, negato per altro molto recisamente da Bignami e Capogrossi (24) dapprima, e poi ancora da Capogrossi in un successivo recentissimo lavoro (25), si può obbiettare che la chinina, come già dimostrò Baccelli sin dal 1897 (26), ha azione chimica oltrechè sul parassita malarico, anche sui prodotti tossici di esso, che si trovano nel sangue e siero malarico; per il che la chinina si potrebbe quasi definire un *anticorpo* artificiale che introduciamo anche per neutralizzare le tossine prodotte dall'infezione. Ora pel solo fatto che il siero vien così alterato da non agire più come prima, possiamo dire che questa azione chimica ancora inesplorata (sulle tossine del siero) si è svolta neutralizzandone le agglutinine? Questo sarebbe affermare più di quanto ci consentano le nostre cognizioni: tanto è vero che, se noi aggiungiamo a questo siero malarico (che più non agglutina) una forte ovvero minima quantità di siero malarico, o anche *normale* (purchè ottenuto per centrifugazione o defibrinazione) e CHINIZZATO ANCHE FORTEMENTE, ecco che torniamo ad avere netto, evidente il fenomeno dell'agglutinazione: dove è in questo caso l'azione specifica del chinino sulle ipotetiche agglutinine malariche?

Noi sappiamo come sia molto facile provocare l'agglutina-

zione tra sangue di uomo sano e sangue di uomo sano, quando si assoggettino le emazie a qualche maltrattamento, che ne provochi una parziale rottura o distruzione. Tale maltrattamento non è punto necessario per ottenere lo stesso effetto quando si saggi sui globuli rossi del cane; e questo appunto per la estrema fragilità a tutti nota e veramente eccezionale delle emazie di tale animale. Questi fatti si ricollegano all'altro della coagulazione del sangue, che possiamo ritardare od anche impedire del tutto, quando si raccolga il sangue stesso, anzichè in un vaso di vetro comune, in uno colle pareti paraffinate.

Anche in questi dati noi troviamo una conferma di più del concetto che assimila agglutinazione e coagulazione, che ci rivela quella come una forma iniziale di questa.

Ancora: da talune esperienze degli stessi Lo Monaco e Panichi risulta:

a) che il fenomeno agglutinante è sempre evidente se al sangue di uomo sano si mescoli sangue o siero di sangue di uomo sano, purchè raccolto non per puntura del dito, ma mediante salasso, e meglio se defibrinato per sbattimento.

b) che con l'aumentare in un sangue di uomo sano la dissoluzione degli elementi figurati di esso, la capacità agglutinante si fa sempre più notevole.

Ora è appunto anche in base a questi dati, che noi possiamo benissimo spiegarci i reperti di Novi e Meruzzi (27), che riscontrarono l'agglutinazione in individui sani ma sottoposti a fatiche eccessive, a strapazzi, a digiuni prolungati; è così che possiamo spiegarci i risultati tanto contraddittorî di molti autori, che usarono un tecnicismo improprio; è così che possiamo comprendere perchè la reazione agglutinante appaia nel malarico ancora prima che scoppi il primo accesso febbrile, mentre cioè l'agente infettante ha invaso un numero ancora assai ristretto di emazie; perchè la reazione agglutinante si fa sempre più accentuata col succedersi degli accessi; perchè tende subito a diminuire non appena si inizia la chinizzazione dell'a.; perchè infine si fa debolissima coll'estinguersi degli accessi febbrili, per scomparire del tutto soltanto quando l'infezione sia assolutamente spenta. Se agglutinazione pur debole esiste, anche senza febbre, ciò significa che il processo malarico non è ancora estinto, e o nel sangue circolante o in qualche organo interno per parte di pochi parassiti continua una distruzione, sia pure su piccola

scala, di emazie: distruzione che non è tale da poterci essere segnalata dall'iperpiressia; ma che però ci vien rivelata dal nostro reattivo: l'agglutinazione; donde finalmente la ragione della persistenza del fenomeno in casi che si sono dichiarati già da tempo guariti, appunto qualche tempo dopo la scomparsa dei sintomi clinici.

È naturale quindi che sia nelle molte infezioni che più o meno direttamente interessano la crasi sanguigna, sia nelle stesse modificazioni o malattie proprie del sangue per svariate altre cause (anemia postpartum, leucemia splenica, anemie perniciose, porpora emorragica, ecc.) il fenomeno dell'agglutinazione appaia costante; pur forse mantenendo per taluna di queste forme morbose (malaria) dei caratteri speciali (*), caratteri speciali sinora riscontrati per la malaria da Lo Monaco e Panichi; ma che ricerche future potranno rivelare per altre infezioni o altre forme morbose.

Infine: è noto che Bordet è riuscito ad esaltare, a rinforzare nel siero di cavie « *vaccinate* » endoperitonealmente più volte con 10-15 cc. di sangue defibrinato di coniglio, il potere agglutinante ed emolizzante *in vitro* rispetto ai globuli rossi di coniglio (vedasi anche Nolf. A. I. P. anno 1900, pagina 297). Ora è lecito domandarci: donde deriva questa forza agglutinante dapprima, emolizzante, di poi, se non dal diretto passaggio nel plasma sanguigno della cavia delle sostanze provenienti dalla distruzione de' globuli iniettati endoperitonealmente? Questa distruzione è provata: si può constatare in capo a 10 minuti perfettamente completa: tale distruzione invece manca del tutto qualora anzichè tra cavia e coniglio si saggi tra cavia e cavia, o tra coniglio e coniglio: le emazie iniettate in questi due ultimi casi restano intatte in questi due ultimi casi nell'essudato peritoneale, e vengono di poi inglobate dai macrofagi: ma in simili casi non si ha per nulla nè agglutinazione, nè emolisi.

Già prima di Bordet, Belfanti e Carbone (28) avevano affermato che il siero di un animale di specie A, iniettato endoperitonealmente con sangue defibrinato di animale di specie B, contiene sostanze, che sono tossiche per la specie B., innocue per la specie A. Belfanti e Carbone infatti ottenevano in 60-80 secondi, con convulsioni violenti, cianosi e di-

(*) Criterio della chinina, criterio della diluzione; vedi lavori citati di Lo Monaco e Panichi.

spnea acutisssime, la morte fulminea del coniglio, quando per via endovenosa gli iniettavano una dose (15 cc.) sufficiente di siero di cavia trattata endoperitonealmente con sangue defibrinato di coniglio. Orbene io mi sono fatta a questo proposito l'opinione che tutto ciò si possa interpretare non come un vero e proprio fenomeno tossico: penso cioè che la morte improvvisa del coniglio dipenda piuttosto da una semplice coagulazione endovasale, o da una embolia provocata dall'altissimo potere agglutinante, e quindi possiamo dire anche coagulante del siero iniettato in circolo; si avrebbe cioè precisamente lo stesso effetto, che si otterrebbe qualora invece di tale siero noi iniettassimo una soluzione di trombina o di nucleoproteide.

Ma se Bordet ci ha provata l'*azione agglutino-emolizzante* del siero di cavia (così vaccinata) *in vitro*, gli studii ancor più recenti di F. Cantacuzéne (29), sulla crasi sanguigna dei conigli iniettati con tale siero di cavia ci hanno dimostrato che anche *in vivo* si esplica molto forte l'azione emolizzante di detto siero.

Naturalmente Cantacuzène parla soltanto dell'azione emolizzante, che egli ha potuto constatare in vivo, così come in vitro l'aveva constatata Bordet. Ma l'azione agglutinante, che precede *in vitro* quella emolizzante, si potrà mettere in dubbio *in vivo*, sebbene non ci sia dato constatarla in modo diretto? Non credo: dappoichè se i reperti di Belfanti e Carbone non ci possono provare tale azione agglutinante, allorchè iniettiamo dosi lievi di siero, che tutto al più potranno provocare piccoli ammassamenti tra le emazie circolanti nel vaso iniettato (allorchè queste vengono a contatto col siero attivo), ce la provano bene quando con alte dosi provochiamo per dire così una « agglutinazione macroscopica » (quale ci appariva nelle prove fatte con soluzioni saline o acide concentrate), causa appunto dei fenomeni embolici, coi quali riesce tanto facile ed evidente spiegare la morte improvvisa dell'animale in esperimento.

Ho voluto vedere se questo concetto poteva essere convalidato dalla prova sperimentale: studiando cioè il sangue di coniglio sano a contatto con siero di sangue di coniglio, nel quale (come per l'infezione malarica), avevo provocato ad arte una distruzione più o meno considerevole e rapida di emazie. Ecco come condussi l'esperienza. Ad una cavia sana di media taglia cominciai coll'iniettare nel cavo peritoneale

2 cc. di sangue di coniglio raccolto asetticamente, e defibrinato. Dodici giorni dopo ripetei con eguale tecnicismo la stessa iniezione, ma portando a 6 il numero dei cc. di sangue; dieci altri giorni dopo ne iniettai altri 10 cc., infine trascorsi altri otto giorni praticai una quarta iniezione di 15 cc. Dalla cavia così *vaccinata* potei ottenere un siero molto emolizzante ed agglutinante. Iniettai allora ad un coniglio sano di grossa taglia in una vena marginale dell'orecchio 2 cc. di questo siero di cavia, e già trascorsa una sola ora da tale iniezione raccolsi parecchi saggi di sangue in tubicini capillari per averne del siero (*).

Era con questo siero che, secondo le previsioni, dovevo ottenere l'agglutinazione delle emazie di coniglio nuovo. L'esperienza difatti riuscì positiva: potei osservare e far osservare anche ad altri i globuli rossi del coniglio sano agglutinati (a gruppetti di 3 5-7 emazie ciascuno) per opera del siero in esame. Il giorno dopo praticai un'altra iniezione endovenosa di 1 cc. e 1/2 di siero emolizzante e, rinnovata la prova dell'agglutinazione, constatai che questa appariva più marcata. Per difetto di mezzi non potei disporre di maggior quantità di siero; ma è presumibile che, continuando con altre iniezioni, il potere agglutinante si sarebbe fatto sempre più forte, precisamente come avviene nella malaria, in cui il fenomeno in parola appare debolissimo al primo inizio dell'infezione, per farsi sempre più accentuato nel succedersi degli accessi febbrili, sino al punto in cui questi declinano per l'intervento della chinina.

Riassumendo da quanto precede, credo si possa ritenere:

1) Il fenomeno dell'agglutinazione del sangue si può produrre artificialmente anzichè con sieri specifici, mediante semplici soluzioni saline o acide, o altre sostanze chimicamente ben note: le quali tutte hanno sulle albumine in genere e sul sangue in specie una azione coagulante.

2) Il fenomeno dell'agglutinazione del sangue ha i caratteri di una forma iniziale di coagulazione.

3) Il fenomeno dell'agglutinazione del sangue, che si riscontra in tante infezioni, ed in tante condizioni fisio-patologiche della crasi sanguigna, si può ritenere come una conseguenza e quindi anche un indice di una distruzione d'ele-

(*) Evidentemente per saggiare l'agglutinazione con globuli rossi di altro coniglio, dovetti preferire il siero, alle emazie del coniglio iniettato.

menti morfologici del sangue nell'organismo; dovuta a cause le più svariate.

a) come tale, il fenomeno in parola può avere una *importanza clinica*;

b) per eventuali caratteri specifici, propri di una data forma di agglutinazione (malarica ad es.), può assurgere a *valore diagnostico*.

(1) Bordet — Sur le mode d'action des sérums préventivs. Annales de l'Institut Pasteur. Avril 1896.
(2) M. Elfstrand — Central. f. Physiol. 1897, XI, pag. 471.
(3) Bordet — A, F. P. Octobre 1898.
(4) Bordet — A. I. P. Mars. 1899. e Avril 1899. Mai 1900.
(5) Nolf — A T. P. Mai 1900.
(6) T. Cantacuzéne — A. I. P. Juin 1900
(7) Ehrlich e Morgenroth — Berl Klin. Woch. nnm 21. Anno 1900.
(8) 15) Lo Monaco e Panichi — Riforma medica, n. 33-34, anno 1902.
(9) Grixoni — Gazz. degli Ospedali, 1901.
(9 bis) Novi e Meruzzi — Policlinico suppl.° num. 38.
(10) Capogrossi — Policlinico, 1901.
(11) Capogrossi — Riforma medica, n 82, anno 1902.
(12) Ascoli — Clinica Medica, 1901.
(13) Pace — Rivista critica di clinica medica, 1901.
(14) Eisenberg — Wiener Klin. Woch. num. 42, 1901.
(15) Altobelli e Memmo — Giorn. med. del R. Esercito. Gennaio 1902.
(16) Malvoz — A. I. P. anno 1897 XI, 582
(17) Hamburger — Arch. f. Physiol. de Du Bois Reymond.
(18) S. G. Hedin — Pflüger's Arch. 1897, pag. 229 e altrove.
(19) Gryns — Idem.
(20) Hofmeister — Idem.
(21) Nolf — A. I. P. octobre 1900.
(21 bis) A. Gorbonnow — Deutsche med. Wochenschrift, luglio, 1901.
(22) Pekelharing — Deutsche med. Wochenschrift, 1902.
(23) Eisenberg — Wiener Klin. Woch., n. 42.
(24 e 25) Capogrossi — luoghi citati.
(26) Baccelli — Policlinico, vol. IV, 1897.
(27) Novi e Meruzzi — loc. cit.
(28) Belfanti e Carbone — Giorn. Acc. Med. Torino, anno 1898.
(29) I. Cantacuzène — A. I. P. loc. cit.